

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 808 888

①⑫ N° d'enregistrement national : 00 06125

①⑮ Int Cl⁷ : G 02 B 21/26, G 02 B 7/00, G 01 N 21/64, 21/01

①⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

①⑫ Date de dépôt : 15.05.00.

①⑬ Priorité :

①⑭ Date de mise à la disposition du public de la demande : 16.11.01 Bulletin 01/46.

①⑮ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

①⑯ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

①⑰ Demandeur(s) : TROPHOS Société anonyme — FR.

①⑱ Inventeur(s) : DELAAGE MICHEL, VILLA PASCAL et WILLIAMSON TONI LOUISE.

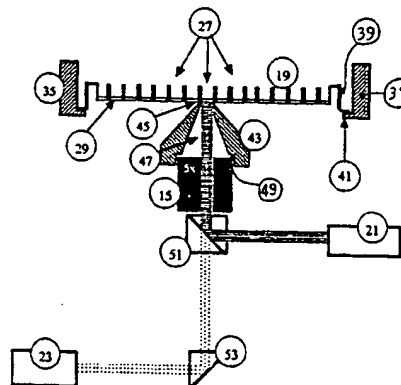
①⑲ Titulaire(s) :

①⑳ Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

①㉔ DISPOSITIF D'OBSERVATION SEQUENTIELLE D'ECHANTILLONS ET PROCEDES L'UTILISANT.

①㉕ La présente invention concerne des procédés et dispositifs pour l'observation ou l'analyse d'échantillons sur un support. Plus particulièrement, il s'agit d'un dispositif de type microscope pour l'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés (côte à côte) sur une même plaque (19) comportant un objectif (15) d'observation d'un échantillon suivant un axe d'observation depuis une face d'observation (29) de la plaque (19), une platine (17) de positionnement de la plaque (19) adaptée pour assurer un déplacement relatif entre la plaque (19) et l'axe d'observation dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation, des moyens (21) d'illumination de l'échantillon et des moyens (23, 25) d'acquisition d'une image en sortie de l'objectif (15). Il comporte une entretoise (43) interposée entre la face d'observation (29) de la plaque et l'objectif (15), laquelle entretoise (43) est fixe par rapport à l'objectif (15) et présente une surface d'appui (45) pour la face d'observation (29) de la plaque, laquelle surface d'appui (45) est située au voisinage de l'axe d'observation.

Application à l'analyse rapide d'échantillons cellulaires.



FR 2 808 888 - A1



La présente invention concerne des procédés et dispositifs pour l'observation ou l'analyse d'échantillons sur un support. Elle concerne plus particulièrement un dispositif de type microscope permettant l'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés (côte à côte) sur un même support, notamment une même plaque.

Ce dispositif (de type microscope) comporte un objectif d'observation d'au moins une partie d'un échantillon suivant un axe d'observation depuis une face d'observation du support et une platine de positionnement du support adaptée pour assurer un déplacement relatif entre le support et l'axe d'observation dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation. Il comporte en outre des moyens d'illumination d'au moins une partie d'un échantillon et des moyens d'acquisition d'une image en sortie de l'objectif.

Un tel dispositif est utilisé notamment pour l'analyse rapide d'un grand nombre d'échantillons disposés sur un même support, tel qu'une plaque, ces échantillons étant constitués par exemple de cellules, en particulier de cellules adhérentes, mammifères, procaryote, végétale, etc. ou d'autres organismes par exemple pathogènes (virus, etc.).

L'analyse cellulaire rapide sur un grand nombre d'échantillons est une nécessité dans l'industrie pharmaceutique, pour le balayage à haut débit de nouvelles substances actives, et dans l'industrie des cosmétiques, où des modèles cellulaires sont utilisés pour tester de nouvelles substances et contrôler les fabrications. Ces industries souhaitent utiliser de plus en plus de tests cellulaires et demandent une simplification de leur mise en œuvre.

Les plaques de culture couramment utilisées pour contenir les échantillons biologiques (notamment cellulaires) ont une forme générale de plateau. Elles présentent un ensemble d'alvéoles adjacents appelés puits dans tout ou partie desquels est contenu un échantillon. Ces puits sont généralement d'axes parallèles les uns aux autres et s'étendent suivant l'épaisseur de la plaque. Ils débouchent à la surface supérieure de la plaque et sont obturés par un fond formant généralement la face inférieure de la plaque. Les fonds de puits adjacents sont donc généralement reliés les uns aux autres. Ainsi, la face inférieure de la plaque est essentiellement continue. D'autres supports pour

l'analyse d'échantillons biologiques sont par exemple des membranes, lames de verre, filtres, etc.

Pour procéder à l'observation microscopique des échantillons, la plaque (ou tout autre support) est disposée au-dessus de l'objectif du microscope dont l'axe est orienté verticalement. L'observation s'effectue au travers du fond de chaque puits, c'est-à-dire au travers de la face inférieure de la plaque, cette face inférieure constituant la face d'observation. Les échantillons sont amenés un à un en regard de l'objectif par déplacement de la plaque dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation grâce à la platine de positionnement. Cette dernière est adaptée pour maintenir la plaque essentiellement (ou seulement) à sa périphérie, laissant ainsi libre la face d'observation de la plaque. En outre, la platine est adaptée pour laisser à la plaque une certaine liberté de mouvement dans l'axe d'observation.

Les plaques sont généralement réalisées dans un matériau coulé ou moulé, le plus souvent en polystyrène. De ce fait, les plaques comportent le plus souvent des défauts de planéité de leur face inférieure formant le fond des puits. La taille de ces défauts dépasse largement la profondeur de champ de l'objectif. L'écart entre les points extrêmes de la face inférieure atteint couramment 0,2 à 0,3 mm.

Les défauts de planéité de la face inférieure de la plaque et sa déformation font varier la distance entre l'objectif et l'échantillon à analyser. Il est donc nécessaire, pour procéder à l'observation d'une plaque complète ou d'échantillons distribués dans des puits répartis sur une zone importante de la surface de la plaque, de corriger fréquemment la mise au point de l'objectif pour compenser la variation de cette distance.

Cet inconvénient se constate par exemple dans le microscope à fluorescence conventionnel, doté d'une caméra CCD et d'un logiciel de morphométrie, commercialisé sous la désignation ARRAYSCAN II par la société CELLOMICS Inc. Le même problème se pose pour la lecture par contraste de phase telle que proposée par la société INNOVATIS dans le matériel CELL-SCREEN.

La mise au point automatique que propose CELLOMICS est lente et peu fiable : un puits vide peut entraîner une instabilité du système, voire une mise au point erronée sur un accident de la face externe.

La nécessité de procéder fréquemment à un réglage de la mise au point de
5 l'objectif réduit la vitesse d'acquisition des images des échantillons.

Un problème analogue se produit lors de l'analyse de micro-particules qui sont de plus en plus utilisées pour effectuer des réactions biochimiques, lorsque ces micro-particules sont disposées dans les puits d'une plaque.

De même, la recherche de bactéries sur des filtres oblige à régler
10 fréquemment la mise au point de l'objectif du fait des défauts de planéité du filtre.

L'invention a pour but d'apporter une solution à ce problème d'acquisition des images en proposant un dispositif, notamment de type microscope, qui puisse fonctionner à une cadence élevée même avec des supports dont la planéité de la face d'observation est imparfaite. L'invention a également pour but
15 de faciliter la vitesse et la qualité de l'acquisition des signaux, et offrant la possibilité d'excitation de l'échantillon sur l'ensemble du champ d'analyse, sans nécessité de balayage au sein d'un même échantillon.

A cet effet, l'invention a pour objet un dispositif tel que défini ci-dessus, notamment un dispositif d'analyse d'échantillons, plus particulièrement de type
20 microscope, caractérisé en ce qu'il comporte une entretoise interposée entre la face d'observation du support et l'objectif, laquelle entretoise est fixe par rapport à l'objectif et présente une surface d'appui pour la face d'observation du support, laquelle surface d'appui est située au voisinage de l'axe d'observation.

Suivant des modes particuliers de réalisation :

25 - le support est une plaque, notamment une plaque multi-puits. Bien que l'emploi de plaques constitue le mode préféré de mise en œuvre, il est entendu que le dispositif d'analyse ou d'observation selon l'invention peut être utilisé avec d'autres supports tels que des membranes, filtres, etc., plus généralement tout support utilisé par l'homme du métier pour le dépôt d'échantillon biologiques,
30 notamment tout support non parfaitement plan sur lequel plusieurs échantillons à analyser sont déposés.

- l'entretoise est portée par l'objectif ;

- l'entretoise comporte un manchon s'étendant suivant l'axe d'observation, la surface d'appui étant formée par une plage annulaire d'extrémité du manchon ;

5 - les moyens d'illumination comportent des moyens de guidage du faisceau d'illumination au travers de l'entretoise ou du manchon ;

- les moyens de guidage du faisceau d'illumination comportent une fibre optique ;

10 - les moyens d'acquisition et les moyens d'illumination comportent des moyens d'autocalibration pour réaliser une correction d'uniformité du faisceau d'illumination à partir de l'observation de billes fluorescentes de référence disposées sur le support portant les échantillons ; et/ou

- les moyens d'illumination sont adaptés pour couvrir simultanément l'essentiel de la surface d'un échantillon ; l'objectif et les moyens d'acquisition sont adaptés pour procurer un champ d'observation couvrant simultanément
15 l'essentiel de la surface de l'échantillon.

L'invention a tout particulièrement pour objet un dispositif, notamment un microscope d'observation séquentielle d'échantillons disposés (côte à côte) sur une même plaque, comportant un objectif d'observation d'au moins une partie représentative d'un échantillon suivant un axe d'observation depuis une face
20 d'observation de la plaque, une platine de positionnement de la plaque adaptée pour assurer un déplacement relatif entre la plaque et l'axe d'observation dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation, des moyens d'illumination d'au moins une partie représentative d'un échantillon et des moyens d'acquisition d'une image en sortie de l'objectif, caractérisé en ce qu'il comporte une
25 entretoise interposée entre la face d'observation de la plaque et l'objectif, laquelle entretoise est portée par l'objectif et présente une surface d'appui sur laquelle repose la face d'observation de la plaque. Ainsi cette face d'observation, au voisinage de l'axe optique, reste à une distance fixe de l'objectif, définie par la longueur de l'entretoise, laquelle est ajustée de sorte que l'image des objets
30 situés sur la face opposée de la face d'observation soit au point sur le capteur.

Un autre objet de l'invention réside dans un dispositif d'analyse d'échantillon, notamment un microscope, caractérisé en ce qu'il possède des moyens d'illumination d'un échantillon, adaptés pour couvrir simultanément

l'essentiel de la surface de l'échantillon, et en ce qu'il comprend un objectif et des moyens d'acquisition adaptés pour procurer un champ d'observation couvrant simultanément l'essentiel de la surface de l'échantillon.

L'invention a en outre pour objet un procédé d'observation séquentielle de
5 plusieurs échantillons disposés sur un même support, notamment sur une même plaque, plus particulièrement côte à côte, ou plus généralement d'analyse d'un ou plusieurs échantillons, caractérisé en ce qu'il comporte l'utilisation d'un dispositif tel que défini ci-dessus.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un dispositif tel que défini ci-avant
10 pour l'analyse d'un ou plusieurs échantillons, comme par exemple pour l'analyse ou la détection d'acides nucléiques, de polypeptides, lipides, organelles, etc., notamment pour des applications de recherche, diagnostique, screening industriel de bibliothèques de produits, etc.

15 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description suivante, donnée uniquement à titre d'exemple et faite en référence aux dessins sur lesquels :

- la figure 1 est une vue en perspective d'un microscope selon l'invention ;
et

20 - la figure 2 est une vue schématique en coupe longitudinale du microscope dans la région de la plaque de culture.

Le microscope 11 représenté sur la figure 1 est destiné plus particulièrement à l'observation de la fluorescence d'échantillons (notamment cellulaires) contenus dans les puits d'une plaque de titration (ou de culture).

25 Il comporte essentiellement un bâti 13 portant un objectif d'observation 15 et une platine 17 de positionnement d'une plaque de titration 19, une source 21 d'illumination locale de la plaque, une caméra 23 placée en arrière de l'objectif 15 et une unité de traitement d'informations 25, tel qu'un micro-ordinateur, reliée à la caméra 23.

30 Ce microscope est adapté pour l'observation rapide d'échantillons contenus dans des puits adjacents 27 de la plaque 19 visible sur la figure 2.

Les plaques utilisées comportent préférentiellement une face inférieure continue 29 formant le fond des puits 27 et constituant une face d'observation au

travers de laquelle les échantillons sont observés. Les puits 27 s'ouvrent à la surface supérieure de la plaque. Ils sont sensiblement cylindriques de section circulaire ou carrée et peuvent avoir un fond essentiellement plan ou arrondi (partie intérieure du fond du puits). Le diamètre de chaque puits est d'environ
5 3 mm, même si le dispositif peut être adapté à tout autre diamètre.

Les plaques utilisées comportent généralement 96, 384, 864 ou 1536 puits. Leurs dimensions sont par exemple 107 mm x 71 mm. De telles plaques sont disponibles dans le commerce (Nunc (Danemark), Greiner (Allemagne), Costar (U.S.A.), etc.).

10 Le bâti 13 est par exemple celui d'un microscope inversé équipé pour l'épi-illumination. Il comporte une tourelle 31 supportant l'objectif 15 de telle sorte que son axe d'observation s'étende sensiblement verticalement.

L'objectif 15 a de préférence un faible grossissement par exemple compris entre 1,25 et 5. Avantageusement, son grossissement est de 2,5 ou 5. Le
15 grossissement est ramené à une valeur proche, par défaut, du rapport entre les dimensions du capteur et celles de l'objet, par des lentilles placées dans la bague allonge qui supporte le capteur. L'objectif a une grande ouverture numérique. En particulier, celle-ci est adaptée pour que le champ d'observation de l'objectif couvre toute la surface du fond d'un puits.

20 La platine 17 est solidaire du bâti 13. Elle est maintenue sensiblement horizontalement en regard de l'objectif 15. Cette platine comporte, comme connu en soi, une structure porteuse 33 fixée au bâti 13 et un cadre 35 de support de la plaque 19. Ce cadre s'étend dans un plan sensiblement perpendiculaire à l'axe d'observation. Il est mobile à coulissement dans ce plan par rapport à la
25 structure porteuse 33. A cet effet, le cadre est guidé par rapport à la structure porteuse entre des paires de glissières s'étendant suivant deux directions perpendiculaires du plan. Deux actionneurs électriques assurent le déplacement du cadre 35 suivant ces deux directions.

Comme représenté sur la figure 2, le cadre 35 présente quatre cotés 37
30 s'étendant le long du contour de la plaque 19. Les dimensions des cotés 37 sont adaptées pour qu'ils s'appliquent en contact intime avec les bords notés 39 de la plaque, tout en autorisant le libre mouvement de la plaque 19 suivant la direction de l'axe d'observation.

Intérieurement, le cadre 35 présente un rebord périphérique 41 formant une surface d'appui pour la plaque 19 en dehors des périodes d'observation. Lors des périodes d'observation, la plaque 19 est à l'écart de cette surface d'appui ou au plus, la plaque ne repose que partiellement sur celle-ci.

5 Selon l'invention, un manchon 43 formant entretoise est solidaire de l'objectif 15. Il prolonge celui-ci axialement et définit, à son extrémité libre, une surface 45 pour l'appui de la face inférieure de la plaque 19 dans le voisinage immédiat du fond du puits contenant l'échantillon à observer. L'autre extrémité du manchon 43 s'appuie sur le bout de l'objectif 15.

10 Le manchon 43 présente une forme générale tronconique. Il définit intérieurement un conduit axial 47 permettant l'illumination et l'observation de toute la surface d'un échantillon depuis l'objectif 15. Le diamètre du conduit est progressivement décroissant de l'extrémité du manchon en appui sur l'objectif jusqu'à l'extrémité libre du manchon définissant la surface d'appui 45. Son
15 diamètre varie ainsi de 12 mm à 4,5 mm. La hauteur du conduit 47 est par exemple d'environ 20 mm.

La surface d'appui 45 est plane et forme une couronne d'appui entourant le fond du puits contenant l'échantillon à observer.

A l'extrémité du manchon en appui sur l'objectif 15, le conduit 47 présente
20 un épaulement 49 définissant une surface annulaire suivant laquelle le manchon repose sur l'objectif.

Suivant une variante de réalisation, des vis de réglage sont prévues entre le manchon 43 et l'objectif 15, afin d'ajuster la position axiale du manchon par rapport à l'objectif. Ces vis sont alors vissées dans l'un de l'objectif et du
25 manchon et une de leurs extrémités prend appui sur l'autre de l'objectif et du manchon. Suivant une variante de réalisation le manchon est constitué de deux parties, vissées l'une dans l'autre en sorte que la distance entre l'appui sur l'objectif et l'appui sur la surface d'observation peut être réglée avec une précision meilleure que la profondeur de champs de l'optique, 50 microns par
30 exemple.

La hauteur du manchon est telle que la position de la surface d'appui 45 ménagée à son extrémité libre est très légèrement supérieure à la position de la surface extérieure moyenne de la face inférieure de la plaque 19, lorsque celle-ci

est en appui sur le rebord 41 du cadre en l'absence du manchon 43. La surface de support 45 fait ainsi saillie avantageusement de 0,3 à 0,5 mm par rapport au plan moyen de la face inférieure de la plaque.

Dans ces conditions, la plaque 19 s'appuie toujours sur la surface 45 du manchon. En particulier, cet appui s'effectue au voisinage immédiat du fond du puits contenant l'échantillon à observer. Il a lieu sur toute la périphérie du fond du puits considéré mais à l'extérieur de celui-ci, laissant ainsi libre toute la surface du fond pour l'observation de l'échantillon.

La source d'illumination 21 est formée par une lampe ou un laser. Elle est adaptée pour provoquer une irradiation de l'échantillon conduisant celui-ci à émettre un rayonnement propre par un phénomène de fluorescence.

Les fluorophores utilisés sont ceux du marquage cellulaire de l'échantillon tel que le marquage de surface, le marquage intramembranaire, le marquage cytoplasmique, le marquage métabolique (pH, activité respiratoire), le marquage des ARN et ADN non spécifique ou spécifique (Fish), ou le marquage de polypeptides (enzymes, récepteurs de surface, protéines cytoplasmiques ou nucléaires, etc.), par exemple.

Le laser utilisé pour la source 21 est par exemple un laser hélium-néon dont la longueur d'onde est 543 nm, un laser argon de longueur d'onde égale à 488 nm, un laser solide à doublement de fréquence dont la longueur d'onde est égale à 532 nm ou une diode laser de longueur d'onde définie dans une plage allant du bleu au rouge.

Dans le mode de réalisation préféré, la source 21 est formée par un laser Argon de longueur d'onde égale à 488 nm, la puissance du laser étant fixée à 25 mW.

Un prisme 51 de renvoi du faisceau incident issu de la source 21 est disposé en arrière de l'objectif 15 pour diriger le faisceau incident suivant l'axe optique de l'objectif 15 en direction de l'échantillon. Ainsi, le faisceau servant à l'excitation traverse l'objectif assurant une observation de l'échantillon par épifluorescence. Pour des raisons de clarté de la figure 2, les axes optiques de la source 21 et de la caméra 23 sont représentés comme étant parallèles alors qu'ils sont en fait perpendiculaires entre eux.

En variante, le faisceau issu de la source d'illumination est guidé jusqu'à l'échantillon par un miroir ou une fibre optique permettant l'illumination de l'échantillon sans traverser l'objectif.

La largeur du faisceau incident rencontrant le fond du puits contenant l'échantillon à observer est telle que la totalité de la surface du puits est illuminée en même temps par le faisceau. Ainsi, la totalité de la surface de l'échantillon est excitée simultanément.

La caméra 23 utilisée comporte avantageusement une matrice de capteurs à couplage de charge, couramment désignés par capteurs CCD. Elle est sensible au rayonnement ré-émis par l'échantillon par phénomène de fluorescence et est adaptée pour produire une image représentative de ce rayonnement.

La caméra est choisie pour pouvoir acquérir simultanément l'image complète d'un échantillon, c'est-à-dire que son champ est suffisamment large pour couvrir le fond d'un puits, en tenant compte de la modification du faisceau opérée par l'objectif 15.

La caméra comporte avantageusement la possibilité de régler le temps d'acquisition et un dispositif de refroidissement du capteur en vue de réduire le bruit de fond.

La caméra est disposée avec son axe optique perpendiculaire à l'axe d'observation. Un prisme ou un miroir incliné 53 est prévu en arrière de l'objectif 15 pour dévier le faisceau en sortie de l'objectif vers la caméra 23. Un filtre dichroïque peut également être inséré pour éliminer la lumière excitatrice.

L'unité de traitement d'informations 25 met en œuvre un programme pilotant la source 21, la caméra 23, et la platine de positionnement 17. En particulier, elle assure la mise en place successive de chacun des échantillons de la plaque en regard de l'objectif et l'acquisition d'une image de chaque échantillon.

L'unité 25 met en outre en œuvre un programme de traitement et d'analyse de l'image acquise de chaque échantillon. Ces traitements comportent par exemple des traitements primaires, tels que des histogrammes de pixels et des analyses d'amas (clusters en langue anglaise), ainsi que des traitements

secondaires tels que des corrections d'excitation, des comparaisons entre puits et des statistiques.

Par ailleurs, l'unité 25 comporte des moyens d'autocalibration du microscope notamment pour réaliser une correction d'uniformité de la lumière
5 excitatrice, ceci à partir de billes fluorescentes de référence disposées dans un ou plusieurs puits de la plaque.

Pour l'observation du contenu d'une plaque, les moyens de positionnement assurent un déplacement de la plaque dans le plan perpendiculaire à l'axe d'observation pour amener successivement chaque échantillon en regard de
10 l'objectif. Pendant ce déplacement et pendant l'observation proprement dite d'un échantillon, la plaque est maintenue, sous l'action de son propre poids, en appui sur l'extrémité du manchon 43. En effet, de part sa structure, la platine de positionnement autorise un libre débattement vers le haut de la plaque suivant la direction de l'axe d'observation. La plaque ne repose alors au plus que
15 partiellement sur le rebord 41 de la platine.

Pendant le déplacement de la plaque sous l'action des moyens de positionnement, la plaque glisse sur la surface d'appui 45 définie à l'extrémité du manchon sur laquelle s'appuie la plaque.

Pendant l'observation, l'échantillon à observer est situé entièrement à
20 l'intérieur de la zone d'appui délimitée par le manchon sur la surface d'observation de la plaque, zone elle-même centrée par l'axe optique. Ainsi, la distance définie entre l'échantillon et l'objectif est la même pour tous les échantillons de la plaque, quelle que soit la planéité de la face d'observation de la plaque. En effet, cette distance est fixée par la seule longueur du manchon 43.

25 Ainsi, la mise au point de l'objectif n'a pas à être refaite par les moyens d'autofocalisation pour chaque échantillon, ce qui diminue considérablement la durée totale d'analyse de l'ensemble des échantillons portés par une même plaque.

Par ailleurs, comme le champ d'observation de la caméra 23 coïncide avec
30 le champ d'excitation de la source 21, ceux-ci couvrant la totalité du fond d'un puits et donc toute la surface de l'échantillon, l'image complète d'un échantillon peut être acquise simultanément, sans qu'il soit nécessaire de précéder à un balayage de l'échantillon. Ainsi, l'acquisition d'une image s'effectue rapidement.

Les dispositifs et procédés de l'invention peuvent être utilisés pour l'analyse d'échantillons d'origine et de nature diverses, marqués selon toute technique connue de l'homme du métier. Il peut s'agir notamment d'échantillons comprenant des cellules d'origine mammifère (notamment animale ou humaine, par exemple de cellules nerveuses, tumorales, immunitaires, etc.), bactérienne, végétale, de levure, d'organismes pathogènes, de virus, de tout échantillon ou prélèvement biologique, etc. Les procédés et dispositifs sont adaptés à l'analyse ou la détection de polypeptides, acides nucléiques, lipides, etc. Ils sont particulièrement utilisables pour la mesure de l'effet de composés tests, notamment de bibliothèques de produits, sur des populations de cellules, par exemple dans des tests à haut débit de l'efficacité, la sélectivité ou la toxicité de produits.

Ainsi, dans un mode particulier, l'invention réside également dans une méthode d'analyse (ou de screening) à haut débit utilisant un dispositif tel que décrit ci-avant, plus particulièrement dans lequel l'échantillon est composé d'une population de cellules mise en contact avec un colorant fluorescent représentatif d'une fonction cellulaire (e.g., prolifération, croissance, maturation, différenciation, mort, survie, apoptose, etc.), l'échantillon étant mis en contact, dans des puits séparés d'une plaque, avec des composés d'une collection test, les composés faisant varier l'intensité du marquage de fluorescence étant mis en évidence. La population de cellules est par exemple une population de neurones, notamment d'origine humaine ou animale.

Dans un mode particulier, le colorant fluorescent est associé à un anticorps associé à un antigène cellulaire. Ces anticorps couplés sont disponibles dans le commerce, par exemple ceux produits par la société Immunotech (Marseille, France).

Selon un autre mode de mise en œuvre, l'invention réside dans un procédé de détection de la présence (ou de la quantité) d'une bactérie dans un ou plusieurs échantillons, comprenant la mise en contact de chaque échantillon avec un marqueur de la bactérie, et l'analyse de la présence du marquage au moyen d'un dispositif tel que décrit ci-avant. Ces marqueurs peuvent être très spécifiques de la bactérie, comme les sondes d'acides nucléiques spécifiques du génome bactérien associées à des marqueurs de fluorescence, ou non

spécifiques tels que l'acridine orange et tous les colorants des acides nucléiques. On les trouve en abondance dans le commerce, voir par exemple le catalogue Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

Selon un autre mode de mise en œuvre, l'invention réside dans un procédé
5 de détection de la présence (ou de la quantité) d'un virus dans un ou plusieurs échantillons, comprenant la mise en contact de chaque échantillon avec un marqueur spécifique du virus, et l'analyse de la présence du marquage au moyen d'un dispositif tel que décrit ci-avant.

Selon un autre mode de l'invention, le dispositif comporte des filtres sur le
10 trajet de la lumière de fluorescence qui délimitent des zones spectrales, par exemple des filtres dichroïques à 530, 585, et 650 nanomètres permettent d'utiliser jusqu'à quatre marqueurs fluorescents différents, avec une seule excitation à 488 nm, ainsi qu'on le pratique en cytométrie de flux. Ces colorants permettent l'analyse de plusieurs paramètres sur la même cellule. De même le
15 faisceau d'excitation peut associer deux sources, soit simultanément, au moyen d'un miroir dichroïque, soit successivement au moyen d'un miroir ordinaire, ce qui étend encore les possibilités de l'analyse multiparamétrique. Si les acquisitions successives se font sans déplacement de l'échantillon, on peut procéder à l'analyse de corrélation des émissions pixel par pixel.

20 L'invention peut également être utilisée pour l'analyse de marquage sur billes, notamment d'interactions protéine-protéine, de complexes immuns, d'hybridations, etc.

Le mode d'acquisition à plusieurs longueurs d'onde est ici particulièrement avantageux, puisqu'il permet la discrimination de plusieurs catégories de
25 particules. Si ces particules sont de taille homogène on peut distinguer des particules présentant des niveaux quantifiés de colorant fluorescent, par exemple une dizaine de niveaux différents. Ces particules peuvent être le siège de réactions analytiques, par exemple d'immunoanalyse, la réaction associée à chaque catégorie de particules peut être quantifiée par un autre marqueur,
30 émettant à une autre longueur d'onde, la même pour toutes les réactions. On peut enregistrer ainsi autant de réactions analytiques différentes que l'on peut distinguer de catégories de particules.

Une autre utilisation de ce type de particules est le codage, lorsqu'elles sont associées à un processus de synthèse combinatoire. L'analyse des particules est le fidèle reflet du composé chimique associé, le contrôle de l'identification pouvant se faire en dehors du laboratoire où s'effectue la mesure, par transmission électronique des données.

Dans une autre utilisation, une population homogène de particules fluorescentes est utilisée pour définir une surface de correction pour l'énergie d'excitation, qui n'est pas uniforme sur tout le champ d'observation; en particulier, les lasers présentent une distribution gaussienne de l'énergie. La mesure de l'énergie réémise par chaque particule reflète le niveau de l'énergie d'excitation au point où elle se trouve. Avec un petit nombre de particules réparties au hasard sur la surface observée, il est possible de définir une surface, par interpolation, qui servira ensuite à normaliser les niveaux des pixels observés sur des échantillons inconnus. Une surface émettrice uniforme peut aussi servir à cette normalisation. Cette opération est nécessaire lorsqu'on veut quantifier une réaction sur une cellule ou une particule réactive.

L'invention peut encore être utilisée pour analyser les dépôts d'acides nucléiques après hybridations avec des sondes, notamment sur puce, microarrays, etc. Il peut s'agir notamment de dépôts d'ADN après hybridation par des séquences correspondantes d'ADN ou d'ARN, issus d'une cellule ou d'un échantillon, et marqués par un élément fluorescent. Ces dépôts se présentent préférentiellement en arrangements réguliers présentant jusqu'à 5000 dépôts qui peuvent être lus en une seule fois par le dispositif. Plusieurs blocs de dépôts placés côte à côte peuvent être lus séquentiellement.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Exemple 1

Dispositif selon l'invention comprenant:

- Un microscope inversé Olympus IX- 50 équipé d'un cube pour fluorescence MWIB, un objectif UMPLFL 5X et un illuminateur vertical 30 W
- Un laser Argon 488 nm, 25 mW, de marque Spectra-Physics
- Une caméra Hamamatsu C5985 refroidie et son contrôleur. Cette caméra
5 dispose d'une plage de réglage importante du temps d'acquisition, depuis 10^{-4} secondes jusqu'à 5 minutes. En utilisation normale selon l'invention le temps d'acquisition est compris entre 0,1 et 1 seconde. Le nombre de pixels est 376151, codés sur 8 bits, soit 256 niveaux, numérotés de 0 à 255. Le refroidissement du capteur représente 20°C en dessous de l'ambiance, assurant
10 une sensibilité de 10 photons.
- Un ensemble de deux tables Märkshaüser 120x100 mm et leur contrôleur de marque Lang.
- Un cadre porte-plaque ajusté aux plaques Nunc 384 puits et un couvercle coiffant la plaque en polymère organique noir, occultant le faisceau laser et la
15 lumière ambiante.
- Un ensemble optique de mise en forme du faisceau laser, comportant deux lentilles convergentes, un filtre spatial (collimateur) de diamètre 30 microns.
- Une entretoise en forme de manchon coiffant l'objectif, en polymère organique noir.
- Un plateau métallique supportant les différents éléments et le capotage de sécurité assurant la coupure du faisceau laser en cas d'ouverture.
20
- Un micro ordinateur PC, avec le logiciel AnalySIS de la société Soft Imaging System (Münster, Allemagne).

25

Exemple 2

Culture de neurones sur plaques 384 puits et comptage selon l'invention:

- 30 Après dissection de la moelle épinière d'embryons de rat de 14 jours les neurones sont purifiés selon la technique décrite dans la demande de brevet européen n° EP99403092.2.

Les neurones purifiés sont ensemencés dans des plaques 384 puits à l'aide d'un robot biomek 2000 dans les plaques préalablement traitées selon le protocole.

Dès que les neurones sont attachés au fond des puits (30 minutes à une heure plus tard), le traitement des cellules avec les molécules à tester est effectué par le robot.

Après 4 jours de culture on procède au test de survie consistant à traiter les cultures avec la calcéine-AM (Molecular Probes) qui devient fluorescent après pénétration dans les cellules vivantes.

La fluorescence émise par chacune des cellules présente dans les puits est détectée grâce à l'analyseur selon l'invention. L'acquisition des images des 384 puits est faite en séquence automatique, avec un temps d'exposition de 0.2 seconde par puits, suivie de l'analyse effectuée automatiquement. La durée totale de l'opération est environ 14 minutes. Le résultat obtenu est présenté sous la forme d'un tableau comportant le comptage du nombre de neurones par puits. Le tableau suivant présente un échantillonnage des comptages, par comparaison au comptage à l'œil effectué au microscope à contraste de phase, en des points sélectionnés correspondant aux contours de la plaque et au milieu. La concordance des résultats témoigne de la régularité de la mise au point lors de l'acquisition automatique.

N° puits	manuel	automatique
1	88	76
2	92	104
13	111	116
24	104	101
169	154	161
180	132	140
192	113	118
193	44	46
205	55	63
216	79	75
337	67	62
359	54	52

361	65	77
362	55	58
384	50	50

Exemple 3

Comptage de billes fluorescentes selon l'invention

- 5 On utilise une suspension de billes fluorescentes "Flow check fluorospheres" (Beckman Coulter, Miami, USA) calibrées au diamètre 10 μ m. Les billes sont déposées dans les puits par un robot de pipetage biomek 2000 (Beckman) à raison de 50 billes par puits, en moyenne, dans une moitié de la
- 10 la plaque (puits 1 à 192) et 100 billes par puits, en moyenne, dans l'autre moitié de la plaque (puits 193 à 384). Après décantation les billes sont comptées à l'œil par l'opérateur (10 puits par concentration, à différents emplacements de la plaque). Puis la plaque est lue par l'analyseur et les résultats sont comparés. On constate que les résultats par le comptage automatique donnent bien les moyennes attendues et que l'écart-type correspond bien à ce que l'on attend
- 15 d'une statistique de Poisson. Sur les puits ayant fait l'objet d'un comptage visuel on constate une parfaite concordance avec le comptage automatique.

N° puits	manuel	automatique
1	31	32
2	43	47
13	65	55
23	64	62
24	55	60
36	62	56
48	41	40
169	68	62
181	56	50
204	111	99
359	116	108
360	128	121
361	96	90

2808888

17

373	99	89
383	88	82
384	135	124

REVENDICATIONS

1.- Dispositif d'observation ou d'analyse d'un ou plusieurs échantillons disposés sur un support, notamment une plaque (19), comportant un objectif
5 (15) d'observation d'au moins une partie d'un échantillon suivant un axe d'observation depuis une face d'observation (29) du support, une platine (17) de positionnement du support adaptée pour assurer un déplacement relatif entre le support et l'axe d'observation dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation, des moyens (21) d'illumination d'au moins une partie d'un échantillon et des
10 moyens (23, 25, 53) d'acquisition d'une image en sortie de l'objectif (15), caractérisé en ce qu'il comporte une entretoise (43) interposée entre la face d'observation (29) du support et l'objectif (15), laquelle entretoise (43) est fixe par rapport à l'objectif (15) et présente une surface d'appui (45) pour la face d'observation (29) du support, laquelle surface d'appui (45) est située au
15 voisinage de l'axe d'observation.

2.- Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un microscope (11).

3.- Dispositif selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le support est une plaque, notamment une plaque 96, 384, 864 ou 1536 puits.

20 4.- Dispositif, notamment microscope (11) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'entretoise (43) est portée par l'objectif (15).

5.- Dispositif, notamment microscope (11) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'entretoise comporte un
25 manchon (43) s'étendant suivant l'axe d'observation, la surface d'appui étant formée par une plage annulaire (45) d'extrémité du manchon (43).

6.- Dispositif, notamment microscope (11) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens d'illumination comportent des moyens (51) de guidage du faisceau d'illumination au travers de
30 l'entretoise ou du manchon (43).

7.- Dispositif, notamment microscope (11) selon la revendication 6, caractérisé en ce que les moyens de guidage du faisceau d'illumination comportent une fibre optique.

8.- Dispositif, notamment microscope (11) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens d'acquisition (23, 25, 53) et les moyens d'illumination (21) comportent des moyens d'autocalibration pour réaliser une correction d'uniformité du faisceau d'illumination à partir de l'observation de billes fluorescentes de référence disposées sur la plaque portant les échantillons.

9.- Dispositif, notamment microscope (11) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens d'illumination (21) sont adaptés pour couvrir simultanément l'essentiel de la surface d'un échantillon et en ce que l'objectif (15) et les moyens d'acquisition (23, 25, 53) sont adaptés pour procurer un champ d'observation couvrant simultanément l'essentiel de la surface de l'échantillon.

10.- Microscope (11) d'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés côte à côte sur une même plaque (19), comportant un objectif (15) d'observation d'au moins une partie d'un échantillon suivant un axe d'observation depuis une face d'observation (29) de la plaque (19), une platine (17) de positionnement de la plaque (19) adaptée pour assurer un déplacement relatif entre la plaque (19) et l'axe d'observation dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation, des moyens (21) d'illumination d'au moins une partie d'un échantillon et des moyens (23, 25, 53) d'acquisition d'une image en sortie de l'objectif (15), caractérisé en ce qu'il comporte une entretoise (43) interposée entre la face d'observation (29) de la plaque et l'objectif (15), laquelle entretoise (43) est fixe par rapport à l'objectif (15) et présente une surface d'appui (45) pour la face d'observation (29) de la plaque, laquelle surface d'appui (45) est située au voisinage de l'axe d'observation.

11.- Procédé d'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés (côte à côte) sur un même support, notamment une plaque (19), caractérisé en ce qu'il comporte l'utilisation d'un dispositif, notamment microscope (11) selon l'une quelconque des revendications précédentes.

12.- Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour l'analyse d'une série d'échantillons, notamment pour l'analyse ou la détection de cellules ou de particules ayant réagi avec des polypeptides, lipides ou acides nucléiques.

13.- Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour l'analyse d'une série d'échantillons de populations cellulaires, sur lesquelles on veut procéder à un dénombrement, à des tests de viabilité ou à des tests d'expression d'antigènes, ou à des tests morphométriques, en mode statique ou cinétique.

14.- Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour l'analyse d'une série d'échantillons dans lesquels on cherche à dénombrier des bactéries.

10

15.- Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour l'analyse d'une série d'échantillons contenant diverses catégories de micro billes, chaque catégorie étant le support d'une réaction analytique avec ledit échantillon.

15

16.- Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour l'analyse d'une série d'échantillons, présentant des arrangements de dépôts d'ADN, sur lesquels ont réagi des sondes nucléiques provenant dudit échantillon, ces sondes étant rendues fluorescentes soit avant soit après l'hybridation.

20

1/2

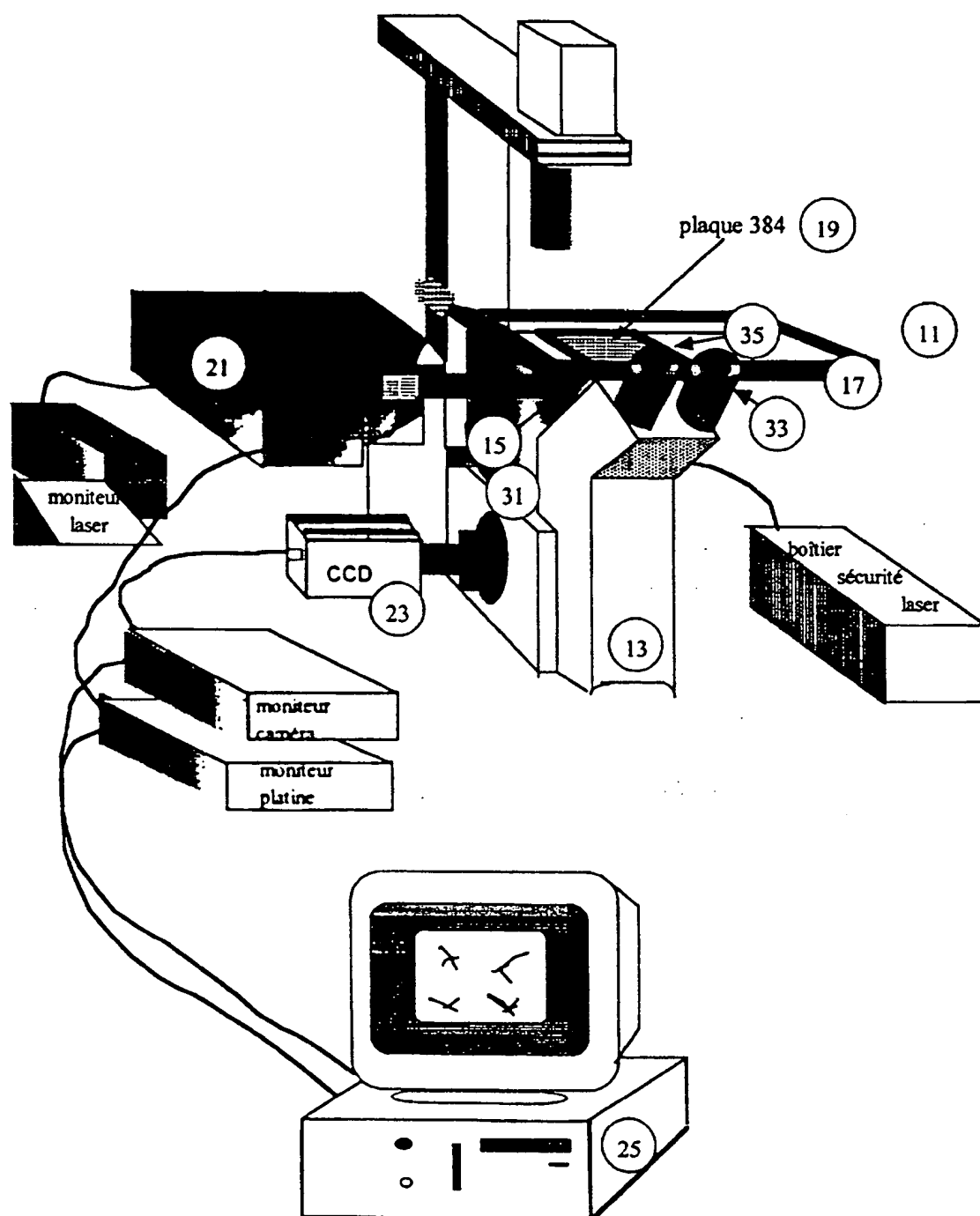


Figure 1 Dispositif d'analyse de particules

2/2

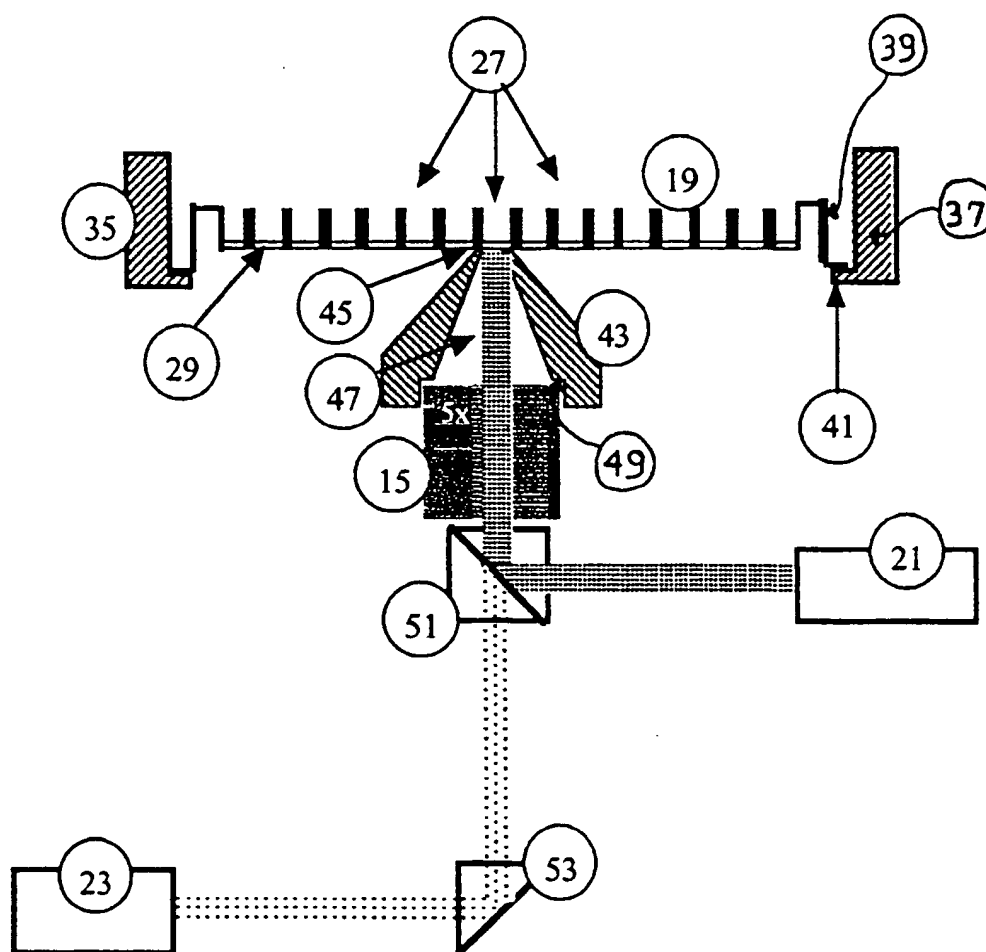


Figure 2 Positionnement de la plaque sur l'objectif



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2808888

N° d'enregistrement
national

FA 587071
FR 0006125

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 764 409 A (COLVIN JAMES BARRY) 9 juin 1998 (1998-06-09) * colonne 2, ligne 47 - colonne 3, ligne 24 * * colonne 5, ligne 3 - colonne 6, ligne 48 * * colonne 9, ligne 6 - colonne 10, ligne 6 *	1-7, 9, 10	G02B21/26 G02B7/00 G01N21/64 G01N21/01
X	FR 2 312 044 A (GEOMETRIC DATA CORP) 17 décembre 1976 (1976-12-17)	1-4, 10	
Y	* page 5, ligne 26 - page 6 *	8, 9, 11-16	
X	CH 508 888 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 15 juin 1971 (1971-06-15) * le document en entier *	1-4, 10	
Y	US 5 671 086 A (FISH RICHARD H ET AL) 23 septembre 1997 (1997-09-23) * colonne 6, ligne 12 - ligne 37 *	8, 9, 11-16	
A	US 5 315 080 A (KACZYNSKI ULRICH ET AL) 24 mai 1994 (1994-05-24) * abrégé *	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			G02B
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 mars 2001		Mollenhauer, R	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

2

EPO FORM 1503 12.99 (POIC14)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.